

УДК 606:577.151.5

ИММОБИЛИЗАЦИЯ ПРОТЕИНАЗ С ЦЕЛЬЮ СОЗДАНИЯ МЯГКИХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ И КОСМЕТИЧЕСКИХ ФОРМ**¹Бунятян Н.Д., ¹Заинкова Н.В., ¹Муравьева Т.И., ²Омельянова А.П., ²Глазова Н.В.**¹*ГБОУ ВПО «Первый МГМУ им. И.М. Сеченова», Москва, e-mail: ndbun@mail.ru;*²*ГБОУ ВПО «СПХФА» Минздрава России, Санкт-Петербург*

В настоящее время в России одним из перспективных направлений в медицине и космецевтике является использование в мягких лекарственных и косметических формах ферментов, которые иммобилизованы на различных носителях, для терапии различных заболеваний. В данной статье рассмотрены возможные носители для иммобилизации ферментов, изучено взаимодействие этих носителей с энзимами, разработаны новые мягкие формы для наружного применения, которые содержат иммобилизованные на различных носителях ферменты, а также изучены методы определения активности ферментов в готовых лекарственных и космецевтических формах. Таким образом, идет расширение ассортимента носителей, которые используются для иммобилизации ферментов на российском рынке, что создает новые возможности для разработки и внедрения перспективных мягких лекарственных и космецевтических форм.

Ключевые слова: ферменты, протеиназы, иммобилизация, наноносители, циклодекстрины, мягкие лекарственные формы

IMMOBILIZATION OF PROTEINASE TO CREATE SEMI-SOLID MEDICINAL AND COSMETIC FORMS**¹Bunyatyan N.D., ¹Zainkova N.V., ¹Muraveva T.I., ²Omelyanova A.P., ²Glazova N.V.**¹*I.M. Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, e-mail: ndbun@mail.ru;*²*State Saint-Peterburg Chemical-Pharmaceutical Academy Ministry of Health of Russia, Saint-Petersburg*

Currently in Russia, one of a promising direction in medicine and cosmeceuticals is using of enzymes, which are immobilized with various carriers, in soft drugs and cosmetic forms for treatment of various diseases. In this article carriers for the immobilization of enzymes were considered, interaction of these carriers with enzymes were studied, developed new soft forms for topical use containing immobilized enzymes in various media and methods for the determination of enzyme activity in the finished forms. Thus, on Russian market expanding range of media used for the immobilization of enzymes, is ongoing, which creates new opportunities for the development and implementation of advanced cosmeceutical and pharmaceutical dosage forms.

Keywords: enzymes, proteinase, immobilization, nanocarriers, cyclodextrines, semi-solid

Фармацевтический рынок является одним из самых высокодоходных и быстро развивающихся секторов мировой экономики: «темпы его роста составляют 8–14 % в год, чистая прибыль достигает 18 % от общего дохода, тогда как в других сферах этот индекс равняется около 5%». Современный фармацевтический рынок по своим объемам уступает только рынку продовольствия, и, по некоторым прогнозным оценкам, уже в ближайшем будущем его доля увеличится до 30–35 % от общего объема потребительского рынка [3].

Результатом активной инвестиционной деятельности ведущих фармацевтических компаний является постоянное появление на рынке новых продуктов, внедрение которых стало тем потенциалом, который лежит в основе движущей силы этой отрасли. В результате фармацевтический рынок является рынком дифференцированного продукта с большим разнообразием лекарственных средств, предназначенных для удовлетворения одной и той же потребности.

Развитие фармацевтической и косметической отраслей промышленности требует разработки и внедрения новых эффективных

препаратов, обладающих высокой конкурентоспособностью на рынке. В этом отношении наиболее перспективными являются гидролитические ферменты. Выявление особенностей структуры и функционирования гидролаз становится особенно актуальным в связи с их биологической ролью.

В настоящее время в клинической медицине достигнуты определенные успехи при лечении энзимами ряда заболеваний. Протеиназы широко применяются в ревматологии, гинекологии, урологии, ангиологии, травматологии. Так как нативные ферменты быстро теряют свою активность в водных растворах, то их нужно использовать непосредственно после разведения и не оставлять на хранение. Это является большой проблемой при создании готовых форм. Одним из путей решения данной проблемы является создание иммобилизованных форм ферментов, т.е. ферментов, которые фиксированы на носителях различной структуры. Иммобилизация позволяет ферментам сохранять активность в течение длительного времени, и особенно актуальна в многокомпонентных системах, таких как зубные гели и пасты. Особое значение при созда-

нии лекарственных препаратов на основе иммобилизованных ферментов имеет подбор соответствующего носителя и способа иммобилизации.

Целью данной работы являлось изучение взаимодействия протеолитических ферментов папаина и химопсина с различными высокомолекулярными и низкомолекулярными соединениями, применяемыми для создания зубных гелей и паст.

Материалы и методы исследования

В качестве носителей для иммобилизации использовали циклодекстрины производства Xian Hong Chang Pharmaceuticals Co., Ltd. Некоторые физико-химические свойства циклодекстринов представлены в табл. 1 [1].

В работе использовали ферментный препарат «Химопсин» производства медицинских препаратов ООО «Самсон-Мед»; папаин, предоставленный ООО «Биопин-Фарма».

Концентрацию белка в растворе определяли по методике, в основу которой положен метод Лоури [2].

Определение протеолитической активности проводили согласно методике, в основу которой положен метод Кунитца [3].

Для определения активности протеолитических ферментов в гелях была разработана специальная методика. Навеску геля массой 1 г помещают в бюкс. Зная концентрацию фермента в геле, производят разведение фосфатным буферным раствором pH = 8,0 до концентрации фермента 0,1 мг/мл, которая обусловлена методикой определения активности фермента.

Концентрацию циклодекстринов в растворе определяли с помощью метода, в основе которого лежит цветная реакция, которую дают моно- и олиго-сахариды с фенолом и концентрированной серной кислотой [4].

Результаты исследований и их обсуждение

Экспериментальные данные по взаимодействию α , β и γ -циклодекстринов с папаином представлены на рис. 1, с химопсином на рис. 2.

Как видно из данных, представленных на рис. 1 и 2, влияние α -циклодекстрина на химопсин практически не проявляется (активность сохраняется на уровне около 100%), а на папаин он оказывает значительное воздействие (активность папаина возрастает до 250% при соотношении 1:2).

β -циклодекстрин оказывает как незначительное ингибирующее, так и активиру-

ющее воздействие. Максимальная активация папаина до 300% при соотношении 1:1, для химопсина 192% при соотношении 1:2.

При взаимодействии химопсина и папаина с γ -циклодекстрином активность химопсина сохраняется на уровне 100% при небольших концентрациях циклодекстрина. При увеличении концентрации циклодекстрина ингибирующее воздействие на папаин усиливается. Отмечается снижение активности до 60% от исходной (в меньшей степени ингибируется химопсин – снижение активности лишь на 20%).

Основываясь на приведенных выше и литературных данных, для дальнейших исследований был выбран β -циклодекстрин, т.к. во многих странах мира он внесен в список веществ, признанных полностью безвредными, а также уже применяется при создании лекарственных форм в фармацевтической промышленности.

Опыты по изучению кинетики через пористые мембраны проводили в двухкамерных ячейках по методу [5]. Камеры разделяли пористой мембраной «Millipore». Мембраны подбирали таким образом, чтобы за определенное время проходил один более низкомолекулярный компонент (β -циклодекстрина). Экспериментальные данные представлены на рис. 3.

По кривой прохождения β -циклодекстрина была рассчитана проницаемость мембраны для данного вещества. Как видно из рис. 3, углы наклона всех прямых прохождения комплексов меньше угла наклона прямой прохождения β -циклодекстрина через мембрану. Это говорит о связывании химопсина с циклодекстрином. Наличие связывания позволяет рассчитать концентрацию свободного и связанного циклодекстрина при смешении с ферментами.

На основании данных, полученных в результате экспериментов по изменению протеолитической активности папаина и химопсина в присутствии различных веществ, кинетике диффузии, были подобраны оптимальные соотношения фермент-компонент и сделаны пробные партии готовых косметических форм. Основной состав данных форм и стабильность ферментов при хранении представлены в табл. 2.

Таблица 1

Физико-химические свойства циклодекстринов

Циклодекстрин	Количество глюкозидных единиц	Молекулярная масса	Диаметр внутренней полости, A	Растворимость, г/100 мл
α (альфа)	6	972	4,7–5,3	14,5
β (бета)	7	1135	6,0–6,5	18,5
γ (гамма)	8	1297	7,5–8,3	23,2

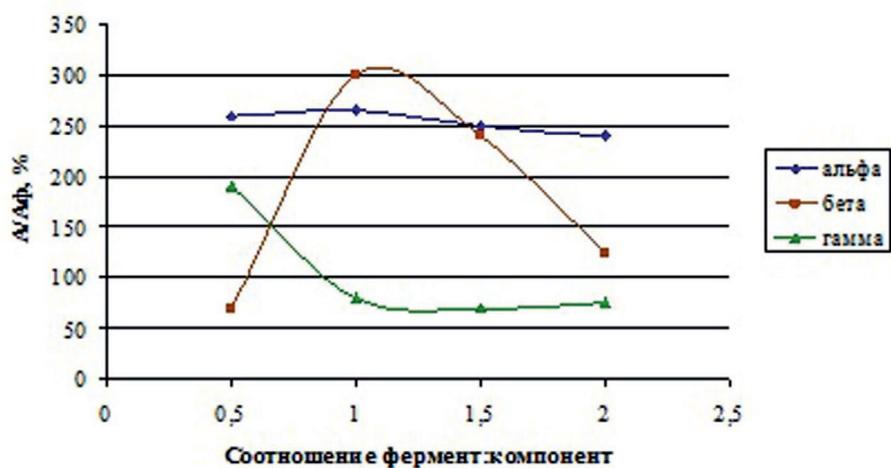


Рис. 1. Влияние α , β и γ -циклодекстринов на протеолитическую активность папаина

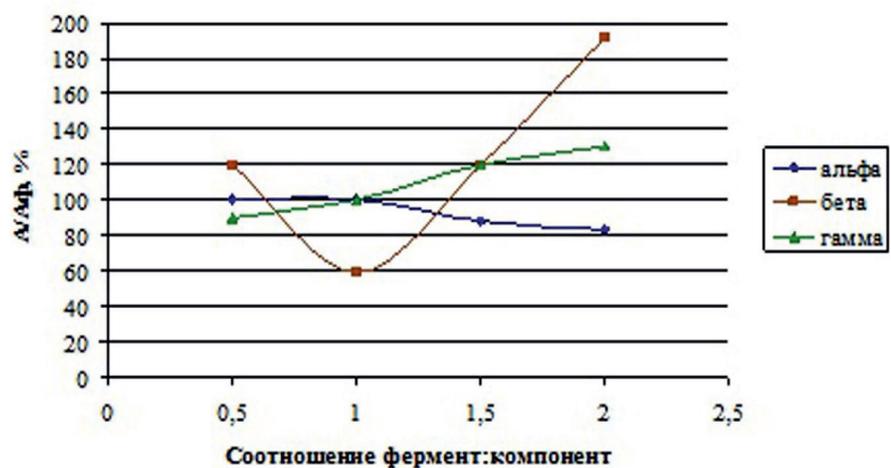


Рис. 2. Влияние α , β и γ -циклодекстринов на протеолитическую активность химопсина

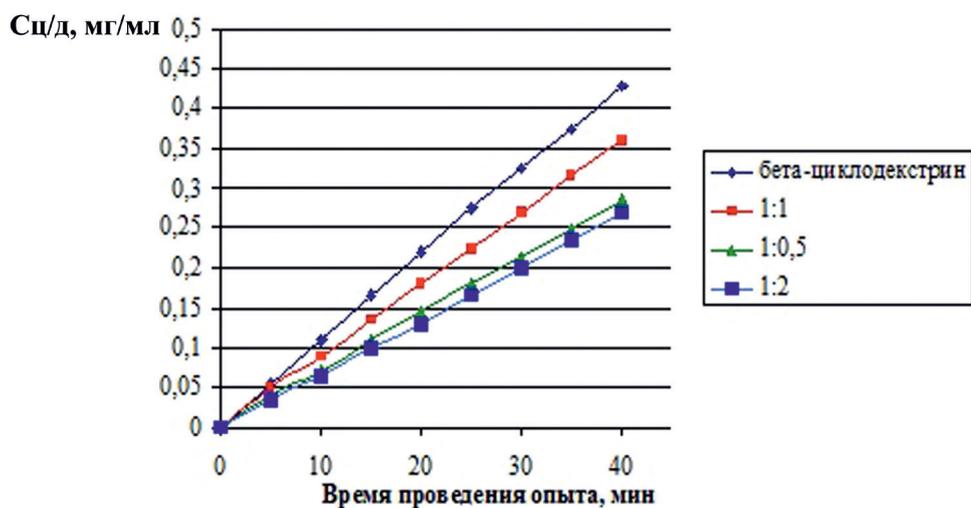


Рис. 3. Кинетика диффузии β -циклодекстрина и комплекса химопсин- β -циклодекстрин через пористую мембрану

Таблица 2

Состав и стабильность при хранении готовой формы

Виды готовой формы	Основные ингредиенты*	Функциональное назначение ингредиента	Стабильность при хранении
Раствор нативного фермента			в течение суток
Лиофильно высушенные ферменты, $\phi < 10\%$			в течение 3 лет
Гель № 1	Полиакриловая кислота Триэтанолламин Папаин	Гелеобразователь Корректировка pH Активное начало формы	в течение одного месяца наблюдения $A_{\text{ост}} = 60\%$
Гель № 2	Полиакриловая кислота Триэтанолламин β (бета)-циклодекстрин Папаин	Гелеобразователь Корректировка pH Системы доставки Активное начало формы	в течение одного года наблюдения $A_{\text{ост}} = 100\%$
Гель № 3	Полиакриловая кислота Триэтанолламин β (бета)-циклодекстрин Химопсин	Гелеобразователь Корректировка pH Системы доставки Активное начало формы	в течение одного года наблюдения $A_{\text{ост}} = 100\%$

Примечание. * в таблице представлен неполный состав геля.

Заключение

Разработка и внедрение новых эффективных форм являются неотъемлемой частью развития фармацевтической и косметической отраслей промышленности. Наиболее перспективно использование иммобилизованных ферментов в мягких лекарственных и косметических формах для терапии различных заболеваний. В данной работе изучено взаимодействие протеолитических ферментов с различными высокомолекулярными и низкомолекулярными соединениями, применяемыми для создания зубных гелей и паст. Показано, что для дальнейшего применения в качестве носителей для иммобилизации наиболее подходящими являются β -циклодекстрины. Были подобраны оптимальные соотношения фермент-компонент и сделаны пробные партии готовых косметических форм. Полученные результаты создают новые возможности для разработки и внедрения перспективных мягких лекарственных и косметических форм.

Список литературы

1. Государственная фармакопея Российской Федерации, XII изд., ч. 1. М.: изд-во «Научный центр экспертизы средств медицинского применения». – 2008. – С. 105–113.
2. Декунов С.С. Глазова Н.В., Омелянова А.П. Модификация протеиназ антибиотиками аминокликозидной структуры // Наноматериалы и нанотехнологии. – 2012. – № 3. – С. 60–64.
3. Фармацевтическая отрасль: обзор рынка, тенденции, прогнозы [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://planetahr.ru/publication> (дата обращения 10.05.2014).

4. Элям Блуэ. Нативные и модифицированные циклодекстрины KLEPTOSE®: многофункциональные вспомогательные вещества для молекулярной инкапсуляции // Фармацевтическая отрасль. – 2011. – № 6 (29). – С. 46–49.

5. DuBois M. Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances // Analytical Chemistry. – 1956. – Vol. 28, № 3. – P. 350–356.

6. Kunitz M. Crystalline soybean trypsin inhibitor. II. General properties // J Gen Physiol. – 1947. – № 30. – P. 291–310.

References

1. Gosudarstvennaya farmakopeya Rossiyskoy federatsii, XII, 2008, no. 1, pp. 105–113.
2. Dekunov S.S., Glazova N.V., Omelyanova A.P. *Nanomaterialy I nanoekhnologii*, 2012, no. 3, pp. 60–64.
3. Farmaceuticheskaja otrasl': obzor rynka, tendencii, prognozy [Elektronnyj resurs]. –Rezhim dostupa: <http://planetahr.ru/publication> (data obrashhenija 10.05.2014).
4. Elyam Blue. *Farmatsevticheskaya otrasl'*, 2011, no. 6 (29), pp. 46–49.
5. DuBois M. *Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. Analytical Chemistry*, 1956, Vol. 28, no. 3, pp. 350–356.
6. Kunitz M. *Crystalline soybean trypsin inhibitor. II. General properties. J Gen Physiol*, 1947, no. 30, pp. 291–310.

Рецензенты:

Ураков А.Л., д.м.н., заведующий кафедрой общей и клинической фармакологии, профессор, ГБОУ ВПО «Ижевская государственная медицинская академия», г. Ижевск;
Романов Б.К., д.м.н., профессор, директор Центра экспертизы безопасности лекарственных средств, ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России, г. Москва.

Работа поступила в редакцию 12.02.2015.